

11º Encontro de Química dos Alimentos

Qualidade dos alimentos: novos desafios

Bragança, 2012
16-19 Setembro

Atas

ISBN
978-972-745-141-8



Ação antimicrobiana de extratos fenólicos de cogumelos silvestres contra *Neisseria gonorrhoeae*

Maria José Alves, Azucena Marques, Isabel C.F.R. Ferreira, Anabela Martins,
Manuela Pintado*

^aCBQF-Escola Superior de Biotecnologia - Universidade Católica Portuguesa Porto

^bCentro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro- Unidade de Chaves

^cCIMO-Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança

*iferreira@ipb.pt)

Palavras chave: Cogumelos silvestres; Atividade antimicrobiana; *Neisseria gonorrhoeae*

RESUMO

Infeções pelo gonococo e por clamídia estão entre as doenças sexualmente transmissíveis mais comuns causadas por bactérias no mundo. Por outro lado, tem-se verificado um aumento de resistência da *Neisseria gonorrhoeae* aos diferentes antimicrobianos usados no mercado, sendo desta forma urgente a descoberta de novas soluções antimicrobianas no combate a esta infecção. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de extratos e respetivos compostos fenólicos puros de nove espécies de cogumelos silvestres, provenientes do Nordeste de Portugal, contra *Neisseria gonorrhoeae* obtida de exsudados da uretra no CHTMAD – Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro. Para a determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI) de crescimento recorreu-se ao método da microdiluição e ao ensaio colorimétrico com cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT). De um modo geral, todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana sobre a *Neisseria gonorrhoeae*, e alguns compostos parecem apresentar boa atividade antimicrobiana para esta bactéria, tornando-se pertinente estudar o mecanismo de ação destes compostos na inibição da bactéria bem como a sua toxicidade celular no sentido de avaliar possíveis aplicações clínicas na terapêutica e mesmo na prevenção da gonorreia.

1. INTRODUÇÃO

A vigilância e controlo dos resultados terapêuticos na última década chamou a atenção para o flagelo da crescente resistência aos antibióticos [1]. O relatório da OMS publicado em 2001 faz referência à estimativa de que mais de seis milhões de casos de gonorreia (infecção causada pela *Neisseria gonorrhoeae*) ocorrem a cada ano e com índices crescentes, principalmente nos países em desenvolvimento. Por outro lado, tem-se vindo a verificar uma resistência emergente deste microrganismo aos agentes antimicrobianos comuns no seu tratamento, sendo um grande obstáculo no controle de gonorreia [2,3]. Em simultâneo, a fonte que anteriormente era abundante em compostos antimicrobianos novos e inovadores tem-se esgotado, tornando a sua produção muito exigente e pouco lucrativa. Assim, é urgente a descoberta de novas soluções antimicrobianas no combate a esta infecção. Os cogumelos têm sido reconhecidos como alimentos funcionais e como uma fonte para o desenvolvimento de medicamentos e nutracêuticos podendo ser uma fonte de antibióticos naturais [4,5]. Por outro

lado, estudos *in vitro* bem como estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de compostos fenólicos extraídos de cogumelos podem diminuir significativamente o risco de problemas graves de saúde através da sua atividade antimutagénica, anti-inflamatória e antibacteriana [6,7]. Tendo por base o referido anteriormente, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de extratos e respetivos compostos fenólicos puros de nove espécies de cogumelos silvestres, provenientes do Nordeste de Portugal, contra *Neisseria gonorrhoeae* obtida de exsudados da uretra no CHTMAD – Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparação dos extratos

Cada amostra de cogumelo liofilizada (ca. 3 g) foi extraída usando uma mistura de metanol: água (80:20; 30 ml) a -20 ° C durante 6 h. Depois de 15 min em banho ultrassónico, o extrato foi centrifugado a 4000g por 10 min e filtrado através de papel Whatman n.º 4. O resíduo foi então extraído com duas porções adicionais de 30 ml da mistura metanol: água. Os extratos combinados foram evaporados, sob pressão reduzida, para remover o metanol e, posteriormente, liofilizados, dissolvidos em água numa concentração de 200 mg/ml e armazenados a -20 ° C para uso posterior.

2.2. Preparação de compostos fenólicos

Os compostos foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a deteção de díodos (HPLC-DAD). Estes foram submetidos à avaliação da atividade antimicrobiana contra *Neisseria gonorrhoeae*. Os compostos foram dissolvidos em água, numa concentração de 10 mg/ml e armazenados a -20 °C para uso.

2.3. Ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana

Para a determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI) de crescimento recorreu-se ao método da microdiluição e ao ensaio colorimétrico com cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT), seguindo a metodologia sugerida por Kuete e seus colaboradores [8] com algumas modificações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da Tabela 1 demonstraram que os nove extratos estudados, na gama de concentrações testadas (10,0-20,0 mg/ml), conseguiram inibir completamente o crescimento de *Neisseria gonorrhoeae*. De todas as espécies testadas, os extratos de *Agaricus bisporus*, *Lactarius deliciosus*, *Russula delica* e *Sarcodon imbricatus* foram aqueles que apresentaram maior atividade em concentrações de extrato muito reduzidas (CMI= 1,25 mg/ml). O extrato de *Leucopaxillus giganteus* apresentou uma CMI = 2,5 mg/ml e o de *Ramaria botrytis* e *Agaricus arvenses* apresentaram uma CMI de 10 mg/ml. O extrato de *Tricholoma*

portentosum demonstrou ser o de menor atividade contra *Neisseria gonorrhoeae*, com uma CMI elevada (20 mg/ml).

Tabela 1. Valores de CMI de extratos de cogumelos contra *Neisseria gonorrhoeae*.

Extratos fenólicos	CMI (mg/ml)
<i>Agaricus arvensis</i>	10
<i>Agaricus bisporus</i>	1,25
<i>Lactarius deliciosus</i>	1,25
<i>Lepista nuda</i>	5
<i>Leucopaxillus giganteus</i>	2,5
<i>Ramaria botrytis</i>	10
<i>Russula delica</i>	1,25
<i>Sarcodon imbricatus</i>	1,25
<i>Tricholoma portentosum</i>	20
Composto de referência	
Ceftriaxon	≤ 1

Dos principais compostos fenólicos derivados do ácido benzoico presentes em extratos de cogumelos, verificou-se que os ácidos protocatéquico, vanílico, 2,4-di-hidroxibenzoico e gálico inibiram a *Neisseria gonorrhoeae* para uma concentração de 1mg/ml, não se verificando qualquer atividade antimicrobiana para o ácido *p*-hidroxibenzoico. Relativamente aos derivados do ácido cinâmico, os ácidos *p*-cumárico, ferúlico e o próprio ácido cinâmico apresentam atividade antimicrobiana para uma concentração de 1 mg/ml (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de CMI de compostos fenólicos de cogumelos com *Neisseria gonorrhoeae*.

Compostos fenólicos	CMI (mg/ml)
Derivados do ácido benzoico	
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	> 1
Ácido 2,4-di-hidroxibenzoico	1
Ácido protocatéquico	1
Ácido gálico	1
Ácido vanílico	1
Ácido siringico	> 1
Derivados do ácido cinâmico	
Ácido cinâmico	1
Ácido <i>p</i> -cumárico	1
Ácido <i>o</i> -cumárico	> 1
Ácido cafeico	> 1
Ácido ferúlico	1
Ácido clorogénico	>1
Composto de referência	
Ceftriaxon	≤ 1

De um modo geral, todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana sobre a *Neisseria gonorrhoeae*, e alguns compostos parecem apresentar boa atividade antimicrobiana para esta bactéria, sendo pertinente estudar no futuro o mecanismo de ação destes compostos na inibição da bactéria bem como a sua toxicidade celular no sentido de avaliar possíveis aplicações clínicas na terapêutica e mesmo na prevenção da gonorreia.

Agradecimentos: Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e COMPETE/QREN/EU- projeto de investigação PTDC/AGR-ALI/110062/2009 e projetos estratégicos PEst-OE/AGR/UI0690/2011 e PEst-OE/eqb/LA0016/2011.

Referências:

- [1] M. Ramellkamp. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin - Proc Soc Exp Biol Med. (1942) **51**:386-9
- [2] WHO. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Diseases: Overview and Estimates. 2001.
- [3] CA Ison, J Pepin, NS Roope, E Dimba, O Seaka, CSF Easmon - Genitourin Med (1992) **68**: 356-360.
- [4] Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.J., Julich, W.D. The pharmacological potential of mushrooms - eCAM (2005) **2**: 285-299.
- [5] Poucheret, P., Fons, F., Rapior, S. Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-Year retrospective analysis - Mycologie (2006) **27**: 311-333.
- [6] Albayrak, S., Aksoy, A., Sagdic, O., Hamzaoglu, E. Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey- Food Chem (2010) **119**: 114-122.
- [7] Surh, Y.J.. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review - Food Chem. Toxicol. (2002) **40**: 1091-1097.
- [8] Kuete, V., Ango, P.Y., Fotso, G.W., Kapche, G.D., Dzoyem, J.P., Wouking, A.G., Ngadjui, B.T., Abegaz, B.M. Antimicrobial activities of the methanol extract and compounds from *Artocarpus communis* (Moraceae). - BMC Complement. Altern. Med. (2011) **25**: 11-42